



TITLE:

Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Konishi, Satoshi

---

CITATION:

Konishi, Satoshi. Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19592>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	小西 聡史
論文題目	Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells (ヒト多能性幹細胞から近位気道上皮スフェロイドを介して機能的な繊毛上皮細胞を分化させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>粘液繊毛クリアランスは、生体の防御に重要な役割を果たす気道上皮細胞の主たる機能の1つであり、その異常は、原発性繊毛機能不全症や嚢胞性線維症などの遺伝子疾患だけでなく慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息など様々な気道疾患の病態に関わっている。ヒト由来の気道上皮細胞を用いた <i>in vitro</i> での気道疾患モデリングは、これらの病態研究や創薬に役立つ可能性があるが、環境や薬剤の影響下にはない患者由来の気道上皮細胞を無制限に入手することは難しかったため、解決手段の一つとしてヒト多能性幹細胞を供給源とする、気道繊毛上皮細胞への効率のよい分化誘導方法が期待されてきた。</p> <p>ヒト多能性幹細胞を、内胚葉、前方前腸を経て、腹側前方前腸へと段階的に分化させる過程で、NKX2.1+腹側前方前腸細胞の単離に有用な表面抗原として Carboxypeptidase M (CPM)を同定し、CPM+細胞の一部がⅡ型肺胞上皮細胞へと分化誘導されうることが既報にて示されているが、本研究では近位気道上皮細胞も発生過程と同様、腹側前方前腸細胞から分化誘導できると仮説を立てた。生体内の気道は複雑な三次元構造からなることから、ヒト多能性幹細胞から段階的に分化誘導した CPM+細胞をマトリゲルを基質として、CHIR99021、FGF10 を添加して三次元培養したところ、SOX2+NKX2.1+の近位気道上皮前駆細胞からなるスフェロイドを形成させることができた。この時点では、気道繊毛上皮細胞は認められなかったため、条件検討の結果、ヒト気道上皮の初代培養に使われている培地を基本とする組成に切り替えることで、肉眼的に観察しうる気道繊毛上皮細胞を分化させることができた。電子顕微鏡では動的繊毛に特徴的な 9+2 構造の横断面とダイニン腕を持つことが確認され、免疫染色では気道線毛上皮細胞の転写因子 FOXJ1 が発現し、管腔側には Acetylated tubulin 陽性の多数の繊毛が観察された。また、PGP9.5+SYP+細胞（神経内分泌細胞）、KRT5+細胞（基底上皮細胞）、SCGB1A1+細胞（クラブ細胞）、MUC5AC+細胞（粘液産生細胞）を観察することができた。これらの細胞はいずれも NKX2.1 を共発現し、脳神経マーカーである PAX6 や甲状腺マーカーである PAX8 は発現しないことから呼吸器上皮細胞であることが示唆された。また、Notch シグナルを抑制することにより、繊毛上皮細胞を効率よく分化させただけでなく、神経内分泌細胞への分化も促進された。ヒト多能性幹細胞由来の FOXJ1+気道繊毛上皮細胞の陽性率は、最大で 72.7～87.1%に達した。</p> <p>次に、ヒト多能性幹細胞由来の気道繊毛上皮細胞の機能評価を行なうため、振動数と粘液輸送能に着目した。まず、スフェロイド内腔の繊毛の動態を評価することが困難だったため、三次元培養から播きかえることにより、気面液面境界下にシート状に培養する方法を確立した。繊毛の振動数は、ハイスピードカメラで撮影した動画から、既報に基づき高速フーリエ変換で算出したところ約 10Hz であり、過去に報告されたヒト気道繊毛上皮細胞の振動数と矛盾のな</p>			

<p>い結果だった。また、粘液輸送能については、繊毛上皮細胞存在下での蛍光ビーズの拡散係数がブラウン運動に比べて有意に大きいことが示された。</p> <p>この方法を応用することで、ヒト多能性幹細胞由来の気道繊毛上皮細胞を今後の難治性気道疾患の病態解明や創薬のための疾患モデリング、さらには、人工気管などの再生医療の研究に役立てられる可能性があると考えている。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>気道上皮細胞は粘液繊毛クリアランスに重要な役割を果たしており、その異常は嚢胞性線維症など様々な疾患の原因となる。試験管内で気道上皮細胞の発生を再現できれば、その異常に起因する疾患の病態解明や創薬スクリーニングにつながる。このため、申請者はヒト多能性幹細胞から効率よく気道上皮細胞を分化させる手法の確立が重要と考えた。第一に、ヒト多能性幹細胞を NKX2-1 陽性の腹側前方前腸細胞に分化誘導し、それらを細胞表面抗原 CPM で単離した。次に腹側前方前腸細胞をスフェロイド形成を経て近位気道上皮前駆細胞に誘導し、それらを新規に開発した三次元培養を用いて、気道上皮細胞(気道繊毛上皮細胞・気道神経内分泌細胞・気道基底細胞・クラブ細胞・粘液産生細胞を含む)へと分化させることに成功した。また、Notch 経路阻害薬を分化誘導の過程で加えることにより、気道繊毛上皮細胞・気道神経内分泌細胞への分化を促進できることを示した。特に気道繊毛上皮細胞の誘導効率は 72.7～87.1%であった。さらに、ヒト多能性幹細胞由来の気道繊毛上皮細胞は、初代培養のヒト気道上皮細胞と同等の繊毛振動数と粘液輸送能を持つ細胞であることを確認した。</p> <p>以上の研究はヒト気道上皮細胞の分化メカニズムの解明に貢献し、将来の呼吸器気道疾患の病態解明や創薬開発、人工気管をはじめとする肺の再生医療に寄与するところ大きい。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成28年2月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
--

